

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
15 septembre 2005 (15.09.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2005/085263 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : **C07H 3/02**, G01N 33/543

(21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR2005/050117

(22) Date de dépôt international : 22 février 2005 (22.02.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité : 0450346 25 février 2004 (25.02.2004) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **COM-MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]**; 31-33 rue de la Fédération, F-75752 PARIS 15ème (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **PERETTI, Véronique** [FR/FR]; 3 impasse du Pré, F-31190 GREPIAC (FR). **VINET, Françoise** [FR/FR]; 22, boulevard Edouard Rey, F-38000 GRENOBLE (FR). **BONNAFFE, David** [FR/FR]; 122, avenue de la République, F-75011 PARIS (FR).

(74) Mandataire : **POULIN, Gérard**; Brevatome, 3, rue du Docteur Lancereaux, F-75008 PARIS (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

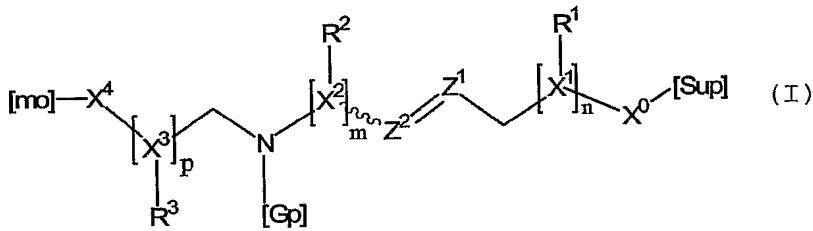
Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: MOLECULAR SPACER, PRODUCTION METHOD THEREOF AND USES OF SAME ON AN ANALYSIS CHIP WITH MOLECULES OR BIOMOLECULES

(54) Titre : BRAS ESPACEUR MOLECULAIRE, PROCEDE DE FABRICATION, ET UTILISATIONS SUR UNE PUCE D'ANALYSE A MOLECULES OU BIOMOLECULES



heteroaryl at C<sub>1-6</sub>; [Gp] = protective group of >N; n, m and n = integers = 1; [Sup] = H or a silanised solid support; and [mo] = H or a molecular unit which is intended to be fixed covalently by means of the spacer to the silanised solid support.

(57) Abstract: The invention relates to a molecular spacer, to a method of fixing a molecular unit to a solid support and to the use of said spacer on analysis chips with molecules or biomolecules. According to the invention, the spacer has formula (I) wherein: X<sup>0</sup>, X<sup>4</sup> = C, O, S, Se, N, P, As; X<sup>1-3</sup> = C, O, N, S, Se, P, As, or aryl, heteroaryl at C<sub>1-6</sub>; Z<sup>1-2</sup> = C-R, Si-R, N, P and As, where R = alkyl at C<sub>1-6</sub>; R<sup>1-3</sup> = H, or alkyl, aryl, heteroaryl at C<sub>1-6</sub>; [Gp] = groupement protecteur de >N; n, m and n = nombres entiers  $\geq 1$ ; [Sup] = H ou un support solide silanisé; et [mo] = H ou une unité moléculaire destinée à être fixée de manière covalente par l'intermédiaire dudit bras espaceur sur ledit support solide silanisé.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à un bras espaceur moléculaire, à un procédé de fixation d'une unité moléculaire à un support solide, ainsi qu'à l'utilisation de ce bras espaceur sur des puces d'analyse à molécules ou biomolécules. Le bras espaceur est de formule (I) : dans laquelle X<sup>0</sup>, X<sup>4</sup> = C, O, S, Se, N, P, As ; X<sup>1-3</sup> = C, O, N, S, Se, P, As, ou aryle, hétéroaryle en C<sub>1-6</sub> ; Z<sup>1-2</sup> = C-R, Si-R, N, P et As, où R = alkyle en C<sub>1-6</sub> ; R<sup>1-3</sup> = H, ou alkyle, aryle, hétéroaryle en C<sub>1-6</sub> ; [Gp] = groupement protecteur de >N ; n, m et n = nombres entiers  $\geq 1$  ; [Sup] = H ou un support solide silanisé ; et [mo] = H ou une unité moléculaire destinée à être fixée de manière covalente par l'intermédiaire dudit bras espaceur sur ledit support solide silanisé.

WO 2005/085263 A1

**BRAS ESPACEUR MOLECULAIRE, PROCEDE DE FABRICATION, ET  
UTILISATIONS SUR UNE PUCE D'ANALYSE A MOLECULES OU  
BIOMOLECULES**

**DESCRIPTION**

**Domaine technique**

5           La présente invention se rapporte à un bras espaceur moléculaire, à un procédé de préparation du bras espaceur reliant une unité moléculaire à un support solide, ainsi qu'à l'utilisation de ce bras espaceur sur des puces d'analyse à molécules ou 10 biomolécules.

Dans l'exposé qui suit, les références entre crochets [] renvoient à la liste de références à la fin de la description.

15           Les puces d'analyse visées par la présente invention sont plus particulièrement, mais non exclusivement, les biopuces et microsystèmes dédiés à l'analyse biologique. Elles se répartissent en trois catégories : les puces à ADN, les laboratoires sur puce (« Lab-On-Chip ») et les puces à cellules 20 (« Cell-On-Chip »).

Actuellement, un nouveau type de biopuce émerge : la puce à sucre (« Glycochip »). Cette biopuce est soit le résultat d'un dépôt d'une substance naturelle ou synthétique, soit le résultat d'une 25 synthèse multiparallèle supportée (chimie combinatoire) de différentes séquences oligosaccharidiques,

représentatives de la diversité moléculaires de certaines grandes familles de glycoconjugués endogènes, par exemple les héparanes sulfates. La présente invention est particulièrement bien adaptée à ce 5 nouveau type de biopuce en permettant notamment la fixation de ces molécules sur des supports de biopuces par un procédé de chimie efficace et simplifié par rapport à l'art antérieur.

Les molécules ou biomolécules, appelées dans la 10 présente « unités moléculaires », qui peuvent être fixées sur un support solide par l'intermédiaire du bras espaceur de la présente invention peuvent être par exemple des acides nucléiques (ADN ou ARN), des sucres, des glycoprotéines, des glycolipides, etc. D'autres 15 exemples encore sont donnés ci-dessous.

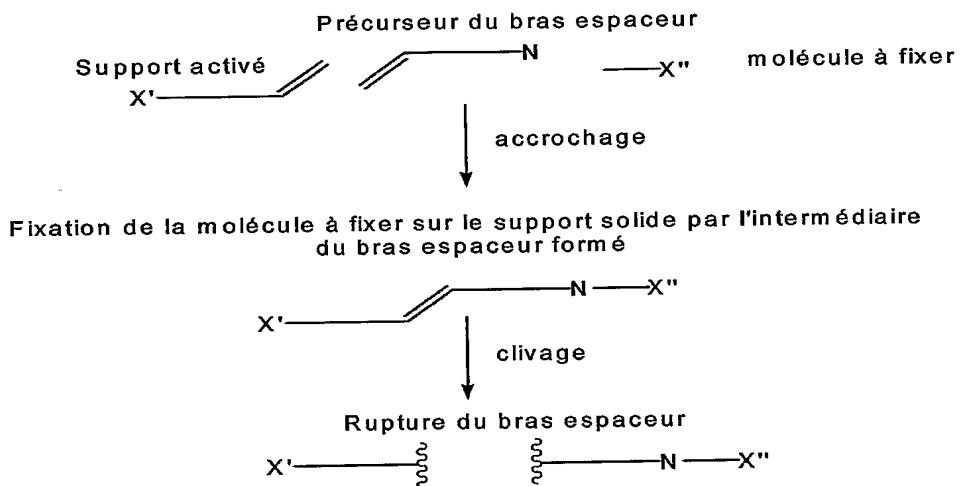
#### **Art antérieur**

Dans la majorité des biopuces, un espaceur fait le lien entre le support solide [2] et, par exemple, 20 les sondes d'oligopeptides, d'oligonucléotides [3] ou d'oligosaccharides [4]. Cet espaceur peut jouer plusieurs rôles à la fois : molécule liante, bras d'éloignement spatial, lieu de clivage de la sonde, etc.

25 La proximité du support avec les sites de reconnaissance des cibles par les sondes peut en effet gêner, voire empêcher la reconnaissance sonde/cible, et donc nuire à la finesse et à la qualité d'analyse des biopuces. Ceci est particulièrement vrai lorsque les

sondes sont petites, par exemple dans le cas des puces à sucre.

L'équation de principe ci-dessous indique le schéma général de la formation puis du clivage de l'espaceur, dans laquelle  $X'$  représente un support solide, et  $X''$  une unité moléculaire.



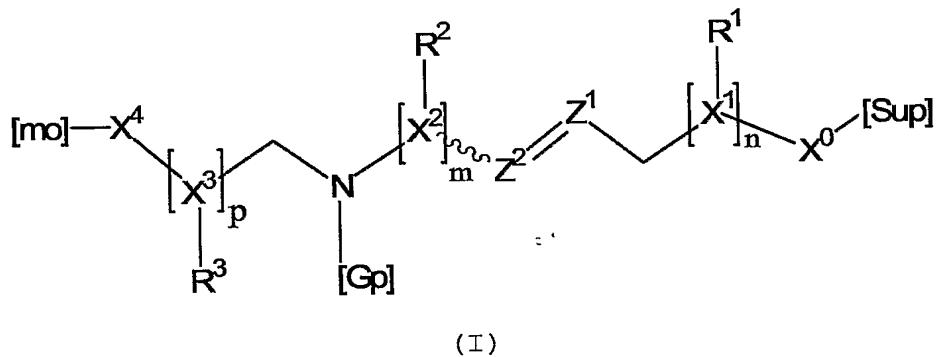
10       · De nombreux bras espaceurs ont été réalisés à ce jour, mais ceux-ci présentent un certain nombre d'inconvénients non résolus. En effet, leur structure implique une limitation sévère des procédés chimiques utilisables pour leur fixation sur le support solide et/ou ils ne permettent de fixer facilement tout type 15 de molécule biologique et/ou ils sont si stables chimiquement qu'une fois fixés sur le support solide leur clivage pour récupérer la molécule biologique ne peut pas se faire facilement, et peut entraîner la détérioration de cette dernière ou du support.

20 Le document [4] (US-A-6,579,725) décrit un bras espaceur fixant des oligosaccharides. Ce bras espaceur,

bien que plus efficace que ceux de l'art encore plus antérieur, ne permet pas de résoudre en même temps tous les problèmes précités. On peut noter également, que sa longueur, sa fonctionnalité, sa réactivité et son 5 encombrement ne peuvent pas toujours être générés à volonté.

#### Exposé de l'invention

La présente invention permet précisément de 10 résoudre en une seule fois les problèmes précités de l'art antérieur en fournissant un bras espaceur moléculaire de formule (I) suivante :



15 – dans laquelle les substituants  $X^0$  ;  $X^1$  ;  $X^2$  ;  $X^3$  ;  $X^4$  ;  $Z^1$  ;  $Z^2$  ;  $R^1$  ;  $R^2$  ; et  $R^3$  sont tels que :

- $X^0$  et  $X^4$  sont chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi C, O, N, S, Se, P, As, Si ;
- 20 •  $X^1$  ;  $X^2$  ; et  $X^3$  sont chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi C, O, N, S, Se, P, As, Si et parmi un aryle et un hétéroaryle comprenant par exemple chacun de 2 à 20 atomes de carbone ;

- $z^1$  et  $z^2$  sont chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi C-R, Si-R, C, N, P et As, où R est un alkyle comportant par exemple de 1 à 40 atomes de carbone ;
- 5 •  $R^1$  ;  $R^2$  ; et  $R^3$  sont chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi H, un alkyle, un aryle et un hétéroaryle comprenant chacun de 2 à 20 atomes de carbone ;
- [Gp] représente un groupement protecteur de l'amine secondaire  $-N-$  ou une molécule participant 10 à la fonctionnalité du bras espaceur ;
  - dans laquelle  $n$ ,  $m$  et  $p$  sont des nombres entiers, chacun supérieur ou égal à 1 et choisi indépendamment l'un de l'autre, de préférence de façon à ce que  $1 \leq n$ , 15  $m$  et  $p \leq 40$  ;
    - dans laquelle [Sup] représente H ou un support solide silanisé sur lequel ledit bras espaceur peut être fixé de manière covalente ; et
    - dans laquelle [mo] représente H ou une unité moléculaire destinée à être fixée de manière covalente par l'intermédiaire dudit bras espaceur sur ledit support solide silanisé.

20 Bien entendu,  $x^0$  à  $x^4$  sont des atomes formant le squelette du bras espaceur de la présente invention, des radicaux choisis par exemple parmi H, O, alkyle, aryle, et un hétéroaryle comprenant chacun de 2 à 20 atomes de carbone pouvant être fixés sur ces atomes.

25 Ce bras espaceur (I) est utilisable, de manière générale, pour fixer sur un support solide [Sup] une unité moléculaire [mo], par exemple pour fabriquer une 30

biopuce, ou plus avantageusement une puce à sucre, où [mo] est généralement une molécule fonctionnalisant ladite biopuce.

Selon l'invention, de préférence, dans le bras 5 espaceur [1] tel que défini ci-dessus :

- $x^0$  et  $x^4$  peuvent être chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi C, O, N, S, Si ; et/ou
- $x^1$  ;  $x^2$  ; et  $x^3$  peuvent être chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi C, O, 10 N, S, Si et parmi un aryle et un hétéroaryle comprenant par exemple chacun de 2 à 10 atomes de carbone ; et/ou
- $z^1$  et  $z^2$  peuvent être chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi C, N, 15 C-R, Si-R, où R est un alkyle comportant de 1 à 30 atomes de carbone, de préférence de 1 à 20 atomes de carbone, de préférence de 1 à 10 atomes de carbone ; et/ou
- $R^1$  ;  $R^2$  ; et  $R^3$  peuvent être chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi H, un alkyle, un aryle et un hétéroaryle comprenant 20 chacun de 2 à 10 atomes de carbone.

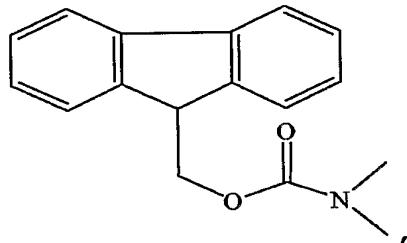
Selon l'invention, n, m et p peuvent aussi être 25 choisis indépendamment l'un de l'autre de façon à ce que  $1 \leq n, m$  et  $p \leq 30$ , de préférence de façon à ce que  $1 \leq n, m$  et  $p \leq 20$ , et de préférence encore façon à ce que  $1 \leq n, m$  et  $p \leq 10$ .

A titre d'exemple, selon l'invention, dans le 30 bras espaceur [1] tel que défini ci-dessus,  $x^0$  et  $x^4$

sont C ; X<sup>1</sup> ; X<sup>2</sup> ; et X<sup>3</sup> sont C ; Z<sup>1</sup> et Z<sup>2</sup> sont C ; R<sup>1</sup> ; R<sup>2</sup> ; et R<sup>3</sup> sont H.

Selon l'invention, le groupement protecteur [Gp] peut être l'un quelconque des groupements protecteurs d'amines secondaires connus de l'homme du métier. Il est choisi de préférence de manière à ce qu'il résiste à la chimie de synthèse du bras espaceur, de sa fixation sur le support et de sa fixation avec l'unité moléculaire [mo]. Il peut être choisi par exemple parmi Ac, Bn (benzyle), un groupement aryle (R) en C<sub>1</sub> à 40, Troc, z, TCA, BOC, Fmoc, etc., pour former avec l'amine secondaire du bras espaceur (I) un des groupes chimiques suivants (>N- indique l'amine secondaire protégée) :

- 15 >N-Ac : acétamide (>N-CO-Me) ;
- >N-Bn : benzylamide ;
- >N-R : arylamide en C<sub>1</sub> à 40 ;
- >N-Troc : 2,2,2-trichloroéthyl carbamate (>N-C(O)OCH<sub>2</sub>CCl<sub>3</sub>) ;
- 20 >N-z : benzyl carbamate (>N-C(O)OCH<sub>2</sub>Ph) ;
- >N-TCA : trichloroacétamidate (>N-CO-CCl<sub>3</sub>) ;
- >N-BOC : t-butyl carbamate (>N-C(O)OCMe<sub>3</sub>) ;
- >N-Fmoc : 9-fluorényméthyl carbamate :



25 (Ph = phényle et Me = méthyle) .

De préférence, selon l'invention, le groupement protecteur est choisi parmi Ac, BOC ou un groupement aryle en C<sub>1</sub> à 40.

Selon l'invention, la molécule [Gp] participant à la fonctionnalité du bras espaceur peut être par exemple un alkyle ou un aryle en C<sub>1</sub> à 40, par exemple en C<sub>1</sub> à 30, par exemple en C<sub>1</sub> à 20 ou en C<sub>1</sub> à 10. Il peut s'agir de tout substituant, pas forcément protecteur, qui peut participer à la fonctionnalité du bras espaceur lorsqu'il est utilisé. Il peut s'agir par exemple d'un groupement hydrophobe, permettant de rendre le bras espaceur plus spécifique et/ou plus sélectif vis-à-vis de la molécule [mo] à fixer, et/ou de son rôle lors de l'utilisation du bras espaceur, par exemple sur une puce à sucre ou à protéine.

Selon l'invention, le support solide peut être par exemple tout support pouvant être silanisé. Il peut s'agir par exemple de plaques, de billes ou de capillaires. Il peut être par exemple à base de silice, de verre, ou d'autres matériaux connus de l'homme du métier, par exemple pour fabriquer les supports ou surfaces de biopuces. La silanisation du support peut être réalisée par tout procédé connu de l'homme du métier.

Selon l'invention, l'unité moléculaire [mo] peut être une molécule naturelle ou synthétique. Il peut s'agir de toute molécule qui doit être fixée sur un support, par exemple pour des raisons analytiques. Il peut s'agir d'une petite molécule, par exemple ayant un poids moléculaire allant d'environ 180 à 400000

g.mol<sup>-1</sup>. Lorsqu'il s'agit d'un sucre, [mo] peut avoir par exemple un poids moléculaire allant de 180 à 10000 g.mol<sup>-1</sup>. Lorsqu'il s'agit d'une protéine ou d'un peptide, [mo] peut avoir par exemple un poids moléculaire allant de 5500 à 400000 g.mol<sup>-1</sup>, 5 généralement allant de 5500 à 220000 g.mol<sup>-1</sup> (poids moléculaire de la plupart des protéines).

Cette unité moléculaire [mo] peut être par exemple choisie parmi les monosaccharides, les 10 oligosaccharides, les poly-oligosaccharides, les glycoconjugués, les peptides, les protéines, les enzymes, les glycoprotéines, les lipides, les acides gras, les 20 glycolipides, les glycolipoprotéines, etc.

Parmi les monosaccharides, on peut citer le 15 glucose, la glucosamine, azidoglucosamine, D-ribose, D-xylose, L-arabinose, D-glucose, D-galactose, D-mannose, 2-désoxy-D-ribose, L-fucose, N-acétyl-D-glucosamine, N-acétyl-D-galactosamine, acide N-acétylneuraminique, acide D-glucuronique, acide L-iduronique, D-sorbitol, 20 D-mannitol, etc.

Parmi les oligosaccharides, on peut citer 25 saccharose, lactose, fragments d'héparanes sulfates, fragments saccharidiques d'héparine, de chondroïtine, de dermatanes sulfates, antigènes Lewis, etc.

Parmi les poly-oligosaccharides, on peut citer 20 parties saccharidiques des héparanes sulfates, de l'héparine, de la chondroïtine, les dermatanes sulfates, etc.

Parmi les glyco-conjugués, on peut citer héparanes sulfates, héparine, chondroïtine, dermatanes sulfates, etc.

5 Parmi les peptides et les protéines, on peut citer chimiokines, cytokines, insuline, fibrinogène, myosine, hémoglobine, etc.

Parmi les enzymes, on peut citer oxydo-réductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases, ligases.

10 Parmi les glycoprotéines, on peut citer glycoprotéines, on peut citer immunoglobuline G, acide hyaluronique, etc.

Parmi les lipides, on peut citer lipides hydrolysables : les graisses (glycérol + 3 acides gras), les cires (acide gras + alcools gras), les esters de stérol (stérol + acides gras), phospholipides (acides phosphatidiques (glycérol, 2 acides gras + phosphate)), les phosphalides (glycérol + 2 acides gras + phosphate), les sphingolipides (sphingosine + acide 20 gras + phosphate + aminoalcool) ; lipides non hydrolysables : alcanes, caroténoïdes, stérols (cholestérol), stéroïdes (estradiol, testostérone), acides (acides gras), eicosanoïdes, etc.

25 Parmi les acides gras, on peut citer acide arachidonique, acide linoléique, acide linolénique, acide laurique, acide nervonique, acide palmitique, acide oléique, etc.

Parmi les glycolipides, on peut citer galactosyl-céramique, glucosyl-céramide, gangliosides, 30 les cérébrosides (acide gras + sphingosine + 1 sucre),

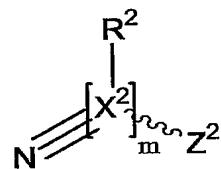
les gangliosides (acide gras + sphingosine + nombreux sucres, de l'acide neuraminique), etc.

Parmi les glycolipoprotéines, on peut citer MPB83 (marque de commerce), GLP19 (marque de commerce) 5 et IRBP (marque de commerce).

La présente invention se rapporte également à un procédé de fixation covalente d'une unité moléculaire [mo] sur un support solide par l'intermédiaire d'un bras espaceur, avantageusement 10 celui de la présente invention.

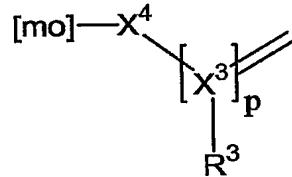
Le procédé peut comprendre les étapes suivantes :

(i) réduction de la fonction nitrile d'un composé de formule :

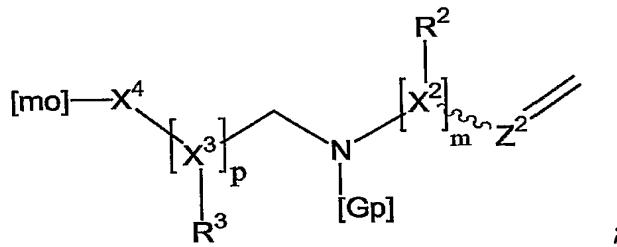


15

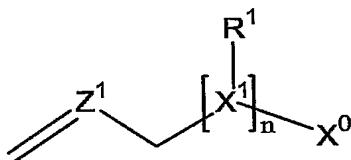
(ii) formation d'une fonction aldéhyde à partir d'une fonction allyle d'une molécule biologique de formule :



(iii) amination réductrice entre ladite fonction nitrile réduite suivie d'une protection de l'amine secondaire formée et ladite fonction aldéhyde pour 20 obtenir une molécule biologique activée pour sa fixation sur le support, ladite molécule biologique activée étant de formule :



(iv) silanisation d'un support solide, et fonctionnalisation du support solide silanisé avec une molécule de formule :

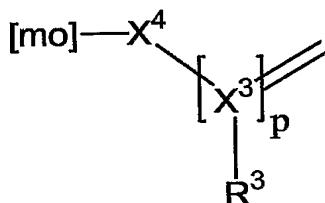


5

(v) réaction de métathèse entre la molécule fonctionnalisant le support et la molécule biologique activée pour former un bras espaceur selon l'invention reliant la molécule biologique et le support.

10 Dans ce procédé, les substituants X<sup>0</sup> ; X<sup>1</sup> ; X<sup>2</sup> ; X<sup>3</sup> ; X<sup>4</sup> ; Z<sup>1</sup> ; Z<sup>2</sup> ; R<sup>1</sup> ; R<sup>2</sup> ; R<sup>3</sup> ; et [mo] sont tels que définis ci-dessus.

Selon l'invention, le composé de formule



15 peut être par exemple un sucre allylé, [mo] étant ledit sucre. Ce sucre allylé peut être obtenu par tout procédé connu de l'homme du métier qui n'altère pas le sucre. Il peut s'agir par exemple du procédé décrit dans le document [5].

Selon l'invention, l'amine secondaire peut en outre être protégée par un groupement protecteur. Ainsi, le procédé de l'invention peut comprendre en outre une étape de fixation d'un groupement protecteur [5] sur la fonction amine secondaire. Le groupement protecteur peut être tel que défini ci-dessus. Sa fixation sur l'amine secondaire peut se faire par tout procédé chimique connu de l'homme du métier, par exemple suivant un des procédés décrits dans le 10 document [7].

Pour mettre en œuvre les différentes étapes de ce procédé de l'invention, les procédés classiques de chimie organique connus de l'homme du métier peuvent être utilisés. Ainsi, à titre d'exemple, pour l'étape 15 de réduction du nitrile, le procédé décrit dans le document [6] peut être utilisé. Pour l'étape de formation d'une fonction aldéhyde à partir d'une fonction allyle d'une molécule biologique, le procédé d'ozonolyse décrit dans le document [5] peut être utilisé. Pour l'étape d'amination réductrice suivie 20 d'une protection de l'azote entre le nitrile réduit et ladite fonction aldéhyde pour obtenir une molécule biologique activée, le procédé décrit dans le document [7] peut être utilisé. Pour l'étape de silanisation du support solide et de sa fonctionnalisation, le procédé décrit dans le document [8] peut être utilisé. Pour la 25 réaction de métathèse, le procédé décrit dans le document [10] peut être utilisé.

Le bras espaceur de la présente invention peut 30 donc être créé à partir de trois parties qui sont liées

d'une part par amination réductrice suivie d'une protection de l'azote du côté de l'unité moléculaire, et d'autre part lors d'une réaction de métathèse de Grubbs. La méthatèse de Grubbs est par exemple décrite 5 dans le document [11].

L'atome d'azote qui est inséré dans la chaîne carbonée présente plusieurs avantages : obtenu lors de l'accrochage de deux chaînons, il se trouve sous la forme d'une amine secondaire que l'on peut protéger de 10 différentes manières pour conférer une réactivité particulière à l'espaceur. Cette fonction avantageusement modulable au cas par cas par différents groupements protecteurs ou par une molécule participant à la fonctionnalité du bras espaceur, permet de faire 15 varier et de maîtriser l'hydrophilie ou l'hydrophobie du bras espaceur et de contrôler son encombrement stérique. Il est aussi avantageusement possible de moduler le caractère électrophile/nucléophile ou acide/basique de cette partie du bras espaceur : la 20 nature des groupements protecteurs de l'atome d'azote est donc de préférence choisie dans le but d'optimiser des conditions de réactions, d'interactions, d'opérations de caractérisations ou d'analyses, et ce, que ce soit avant ou après clivage de l'espaceur pour 25 libérer l'unité moléculaire. Par exemple avec un groupement acétyle on obtient du fait de sa petite taille un faible encombrement stérique, ce qui permet une optimisation de la reconnaissance moléculaire lors de l'utilisation du bras espaceur, par exemple sur une 30 puce à molécules. Par exemple aussi, avec un groupement

butyle, on obtient un substituant carboné hydrophobe qui rend cette partie du bras espaceur hydrophobe, ce qui permet par exemple une reconnaissance de protéines hydrophiles plus spécifique, plus sélective, vis-à-vis 5 des parties hydrophiles du bras espaceur ([mo]).

La présente invention fournit donc un bras espaceur (ou « espaceur ») modulable, dont les différentes structures influencent la réactivité du 10 bras, c'est-à-dire son comportement chimique et/ou électrochimique et/ou stérique.

La présente invention est réalisable de manière simple et efficace et l'espaceur présente avantageusement les trois propriétés suivantes, 15 notamment lorsqu'il est mis en œuvre pour la fabrication de puces à sucre :

20 - tout d'abord, l'espaceur occupe bien la fonction de bras permettant d'éloigner la chaîne sucrée de la surface solide qui supporte cette chaîne.

- ensuite l'espaceur est un bras clivable : il est possible d'ouvrir facilement et de manière ciblée l'espaceur pour isoler le sucre de la phase supportée.

25 - enfin, l'espaceur, de par son faible taux de fonctionnalité chimique, reste inerte dans de nombreuses conditions de réactions réalisées lors de synthèses organiques sur des unités sucrées par exemple et lors de l'utilisation des puces à sucre.

Outre les avantages précités, les inventeurs ont noté les suivants lors des différentes expérimentations de mise en œuvre de la présente invention :

5 - Le bras espaceur permet de pallier les problèmes stériques dus à la présence du support solide. Il permet d'étudier dans de bonnes conditions stériques les interactions protéines/sucres sur les puces à sucre obtenues. Il résout les problèmes 10 d'encombrement stérique qui se présentaient dans l'art antérieur lors de l'approche de la protéine vers les ligands sucrés et nuisaient aux futures interactions potentielles.

15 - La longueur du bras est modulable : un choix judicieux d'homologues fonctionnels de tailles différentes, en particulier par le choix des réactifs de départ, permet de préparer des espaceurs de tailles différentes.

20 - Il est non seulement possible de choisir la distance entre la chaîne sucrée et le support solide mais aussi de contrôler le caractère hydrophile ou hydrophobe de cette partie de l'espace au moyen du groupement protecteur.

25 - La simplicité de la structure chimique de l'espaceur lui confère des propriétés de non réactivité chimique lors des nombreuses réactions organiques lors de sa fabrication et lors de l'utilisation de la puce à sucre.

30 - L'espaceur, de par son absence de fonctions chimiques interactives n'a pas d'influence sur des

interactions potentielles avec d'autres molécules, lorsque le système est utilisé dans le cadre d'une puce à sucre ou plus généralement d'une puce à petites molécules.

5 - L'espaceur est clivable de manière précise et sélective au niveau de sa double liaison C=C, dans des conditions de réactions qui n'altèrent pas la molécule biologique, par exemple oligosaccharidique. En effet, on peut utiliser commodément pour le clivage 10 par exemple une ozonolyse (O<sub>3</sub>), une métathèse de Grubbs (catalyseur de Grubbs), ou une dihydroxylation suivie d'une coupure oxydative de diolosmylation (OsO<sub>4</sub>, NaIO<sub>4</sub>), et d'autres réactions chimiques douces connues de l'homme du métier.

15 - Le fait que l'espaceur soit aisément clivable, et que cette coupure ne modifie pas la structure du sucre, permet de réaliser des contrôles analytiques structuraux et conformationnels de la chaîne oligosaccharidique isolée. Il est en outre aisément 20 de calculer la quantité de sondes sucrées accrochées (« loading ») sur le support solide pendant la synthèse sucrée.

Un des intérêts de cet espaceur, en comparaison avec celui décrit dans le document [1] (l'octènediol 25 par exemple) réside dans l'adaptabilité de sa longueur, de sa fonctionnalité, de sa réactivité et de l'encombrement stérique qui peuvent être générés à volonté.

Les inventeurs notent également que l'espaceur 30 de la présente invention permet la liaison avec une

très grande gamme de saccharides, d'oligosaccharides ou polysaccharides qui sont très souvent présynthétisés et protégés en position anomérique de leur partie réductrice par un groupement allyle. En une étape, ces 5 unités sucrées peuvent en effet être transformées pour se lier directement sur l'espacer. Ainsi, cet espacer est avantageusement compatible avec de nombreuses molécules sucrées déjà synthétisées et décrites dans la littérature, par exemple dans les documents [7], [12] 10 et [13].

La présente invention peut par exemple être utilisée pour la fabrication d'une puce à sucre, par exemple d'une puce susceptible d'identifier par criblage des séquences oligosaccharidiques 15 reconnaissant une protéine particulière, par exemple suivant la technique décrite dans le document [1]. Dans cette application, la présente invention permet d'optimiser les procédés de criblage et donc de disposer plus efficacement et plus rapidement de 20 molécules à visée thérapeutique ou biotechnologique. On peut s'attendre à ce que cette capacité existe également dans les autres applications de la présente invention.

La présente invention peut également être utilisée sur les biopuces où un bras espacer doit faire le lien entre le support solide et des sondes 25 d'oligopeptides, d'oligonucléotides et/ou d'oligosaccharides. En particulier, le bras espacer de la présente invention peut être utilisé sur une puce à 30 oligopeptides telle que celle décrite dans le document

[3], sur une puce à oligosaccharides telle que celle décrite dans le document [4].

D'autres caractéristiques et avantages apparaîtront encore à l'homme du métier à la lecture 5 des exemples qui suivent donnés à titre illustratif.

#### **Exemples**

10 1) A titre d'exemple, la synthèse d'un espaceur de longueur correspondant à une chaîne de quatorze carbones est exposée ci-dessous, en utilisant des protocoles opératoires choisis parmi ceux accessibles à l'homme du métier. Les références en caractères gras renvoient au schéma réactionnel ci-dessous.

15 Les composés choisis sont : un monosaccharide (1) du type glucose (1) (N-acéthylglucosamine (GlcNac) : sucre allylé en position 1) constituant l'unité moléculaire [mo] ; le 4-pentènenitrile (3) portant la fonction nitrile à réduire ; et le 7-octényltriméthoxysilane (8) pour la fonctionnalisation 20 du support. Le support solide est constitué par des billes (6) Controlled Pore Glass (CPG) (marque de commerce) à base de silice.

25 Le schéma réactionnel ci-dessous résume l'ensemble des réactions chimiques entreprises dans ces exemples pour la fixation d'un oligosaccharide (1) sur un support (6) au moyen d'un bras espaceur conforme à la présente invention. Ces réactions chimiques sont indiquées par les lettres A à F. Un exemple d'une réaction de clivage du bras espaceur est présenté dans 30 l'exemple G ci-dessous.

Sur ce schéma réactionnel, les groupements « R » indiqués sur le sucre n'ont pas été différenciés volontairement pour simplifier la représentation. Ces « R » représentent des substituants, identiques ou 5 différents entre eux aux différentes positions sur le cycle formant le sucre, et pouvant les substituants rencontrés généralement sur les sucres. Dans l'exemple particulier présenté ici, le sucre utilisé étant le N-acéthylglucosamine, l'homme du métier n'a aucune 10 difficulté pour identifier les substituants « R » aux différentes positions des composés (1), (2), (5) et (10).

**Exemple A : Activation de l'oligosaccharide**  
15 (réaction A)

Une réaction d'ozonolyse est utilisée dans cet exemple. Le procédé utilisé est décrit dans le document [5]

Le sucre allylé en position anomérique (1) 20 (0,93 mmol) est dissous dans 5 ml d'un mélange de dichlorométhane et de méthanol (1/1) : le milieu est plongé dans un bain froid à une température de -78°C (acétone + carboglace). L'ozone O<sub>3</sub> doit alors barboter dans la solution : dès l'apparition de la couleur bleue (caractéristique d'un excès d'ozone), l'ozone est 25 remplacée par l'argon (ou l'azote). La réaction étant terminée, le milieu est rendu réducteur par ajout de diméthylsulfure Me<sub>2</sub>S (4,65 mmol, 5 éq) : il se forme alors du diméthylsulfoxyde DMSO. Le milieu remonte 30 lentement à température ambiante pendant une nuit, puis

est évaporé sous vide : le résidu organique est repris au diéthyléther Et<sub>2</sub>O, et lavé à l'eau. Les phases organiques sont évaporées sous vide, puis co-évaporées au toluène. Le produit brut est purifié par 5 chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : éther de pétrole/acétate d'éthyle : 8/2).

Ainsi, l'aldéhyde (2) est obtenu avec un rendement de 75%.

10 **Exemple B : Réduction d'un nitrile (réaction B)**

Le procédé chimique utilisé est décrit dans le document [6].

15 L'hydrure de lithium aluminium LiAlH<sub>4</sub> (381 mg, 10,03 mmol, 1 éq) est introduit dans le diéthyléther fraîchement distillé (20 ml).

20 Le 4-pentènenitrile (3) (814 mg, 1 ml, 10,03 mmol) est ajouté lentement au milieu réactionnel agité sous atmosphère d'azote, à une température de 0°C (bain de glace). L'agitation doit continuer environ 20 minutes à température ambiante.

25 Ensuite de l'eau (0,4 ml), puis une solution de soude à 20% dans l'eau (0,3 ml), et enfin une autre quantité d'eau (1,4 ml) sont additionnées : ces ajouts doivent être réalisés avec beaucoup de précaution car la neutralisation peut être violente. Lorsque la solution de diéthyléther est décantée du résidu blanc inorganique, le surnageant est extrait.

30 Le solide (résidu) blanc est lavé à deux reprises au diéthyléther, et les phases organiques sont réunies. Une solution d'acide chlorhydrique HCl 3 M est

ajoutée à cette phase organique pour obtenir un pH acide ( $\text{pH} < 7$ ) : le 4-pentènenitrile n'ayant pas réagi reste dans la phase éthérée, alors que l'amine passe en phase aqueuse.

5           Après extraction, la phase aqueuse est donc conservée et se voit ajouter une solution de soude  $\text{NaOH}$  3 M pour passer à un pH basique ( $\text{pH} > 7$ ) : le produit aminé va alors passer dans la phase éthérée pendant cette nouvelle extraction. La phase éthérée ainsi 10 extraite est séchée sur sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ ), puis évaporée sous vide (évaporateur rotatif).

L'amine brute (4) est alors purifiée par distillation fractionnée (four à boules,  $T \approx 96^\circ\text{C} \pm 9^\circ\text{C}$ ).

15           Analyse  $^1\text{H}$  RMN (Brücker AM 250) :

5,82 (ddt,            $^3J_{\text{trans}} = 18$  Hz,            $^3J_{\text{cis}} = 13$  Hz,  
 $^3J(\text{H}^{\text{I}}) = 6,5$  Hz, 1H,  $\text{CH} =$ ), 5,00 (m, 2H,  $\text{CH}_2 =$ ), 2,70 (t,  
 $^3J_{\text{II}} = 6,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_{\text{III}}$ ), 2,10 (ttd,            $^3J(\text{H}_{\text{II}}) = 6,5$  Hz,  
 $^3J(\text{HC}) = 6,5$  Hz,            $^3J(\text{H}_2\text{C}-) = 1,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_{\text{I}}$ ), 1,70 (s, 2H,  
20            $\text{NH}_2$ ), 1,56 (quint.,            $^3J(\text{H}_{\text{II}}) = ^3J(\text{H}_{\text{III}}) = 6,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_{\text{II}}$ ).

Analyse  $^{13}\text{C}$  RMN (Brücker AM 250) :

138,6 ( $\text{CH} =$ ), 114,6 ( $\text{CH}_2 =$ ), 42,0 ( $\text{CH}_2\text{--N}$ ),  
33,1 ( $\text{CH}_2$ ), 31,4 ( $\text{CH}_2$ ).

25

**Exemple C : Amination réductrice (réaction C)**

Le procédé chimique utilisé est décrit dans le document [7].

L'aldéhyde (2) (20,87 mmol) est mis en solution 30 dans le diméthylformamide (1,2 ml) fraîchement distillé

sur hydrure de calcium ( $\text{CaH}_2$ ) : le milieu est mis sous agitation et l'amine (4) (31,30 mmol, 2 éq) est additionnée. Après une vingtaine de minutes, le cyanoborohydrure de sodium  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (83,47 mmol, 4 éq) 5 est ajouté au mélange, qui est laissé sous agitation à température ambiante pendant une nuit.

Si la réaction n'est pas terminée, il est possible de rajouter du  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (1 éq). Ensuite, lorsque la réaction est terminée, la pyridine (2,4 ml) 10 et l'anhydride acétique  $\text{Ac}_2\text{O}$  (83,47 mmol, 2 éq/amine) sont ajoutés au mélange.

Lorsque la réaction est terminée (environ 1 heure après l'addition), le composé brut est extrait au diéthyléther et à l'eau. Les phases organiques réunies 15 sont séchées sur sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ ), puis filtrées, évaporées sous vide puis co-évaporées au toluène.

Le composé (5) est alors purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient d'éluant 20 cyclohexane/acétate d'éthyle de 7/3 à 5/5).

**Exemple D : Fonctionnalisation du support solide (réactions D et E)**

Le procédé chimique utilisé est décrit dans le 25 document [7].

Les billes Controlled Pore Glass (6) (CPG, 500  $\text{\AA}$ , 2 g) sont agitées de manière très douce pendant 2 heures à température ambiante dans une solution de soude  $\text{NaOH}$  (700 mg) dans l'eau désionisée EDI (6 ml) et 30 l'éthanol  $\text{EtOH}$  à 99% (8 ml). Puis les billes sont

centrifugées, le surnageant est extrait, les billes sont lavées abondamment à l'EDI pour atteindre un pH neutre.

Les billes sont ensuite séchées sous vide (évaporateur rotatif), et restent 1 heure à température ambiante dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl 0,2 N) avant d'être lavées à l'eau, centrifugées, séchées puis mises à l'étuve pendant 15 minutes à 80°C. Elles sont alors lavées à l'éthanol, puis au toluène (centrifugeuse).

Elles sont ensuite séchées avant de participer à l'étape suivante de silanisation dont le mélange réactionnel aura été préparé juste avant l'emploi.

Les billes CPG (7) sont introduites dans un mélange de toluène (45 ml), triéthylamine Et<sub>3</sub>N (1,35 ml) et de 7-octényltriméthoxysilane (8) (C<sub>11</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>Si, M 232,39, 100 µl) : le milieu réactionnel est mis à 80°C pendant 16 heures (étuve).

Les billes sont extraites du mélange par centrifugation, et sont rincées à l'éthanol à plusieurs reprises puis séchées (évaporateur rotatif). Elles sont alors soumises à une température de 110°C pendant 3 heures pour réaliser l'étape de réticulation (étuve).

Les étapes de silanisation et de réticulation étant ainsi réalisées, il est nécessaire de neutraliser l'acidité et l'hydrophilie résiduelles des silanols de surface n'ayant pas réagi au cours de l'étape de silanisation (« end-capping »). Une solution de chlorure de triméthylsilyle TMSCl (109 mg, 130 µl) et de triéthylamine Et<sub>3</sub>N (506 mg, 700 µl) dans le

dichlorométhane DCM (10 ml) est ajoutée aux billes CPG silanisées, et le mélange est laissé sous agitation douce pendant 2 heures à 25°C.

Les billes sont alors rincées abondamment au dichlorométhane (centrifugeuse), puis à l'acétonitrile (centrifugeuse). Elles sont ensuite séchées sous vide (évaporateur rotatif), et mises à l'étuve (80°C) pour parfaire le séchage.

Les billes silanisées (9) sont ainsi obtenues.

10

#### **Exemple F : Réaction de métathèse (réaction F)**

Le procédé chimique utilisé est décrit dans le document [9].

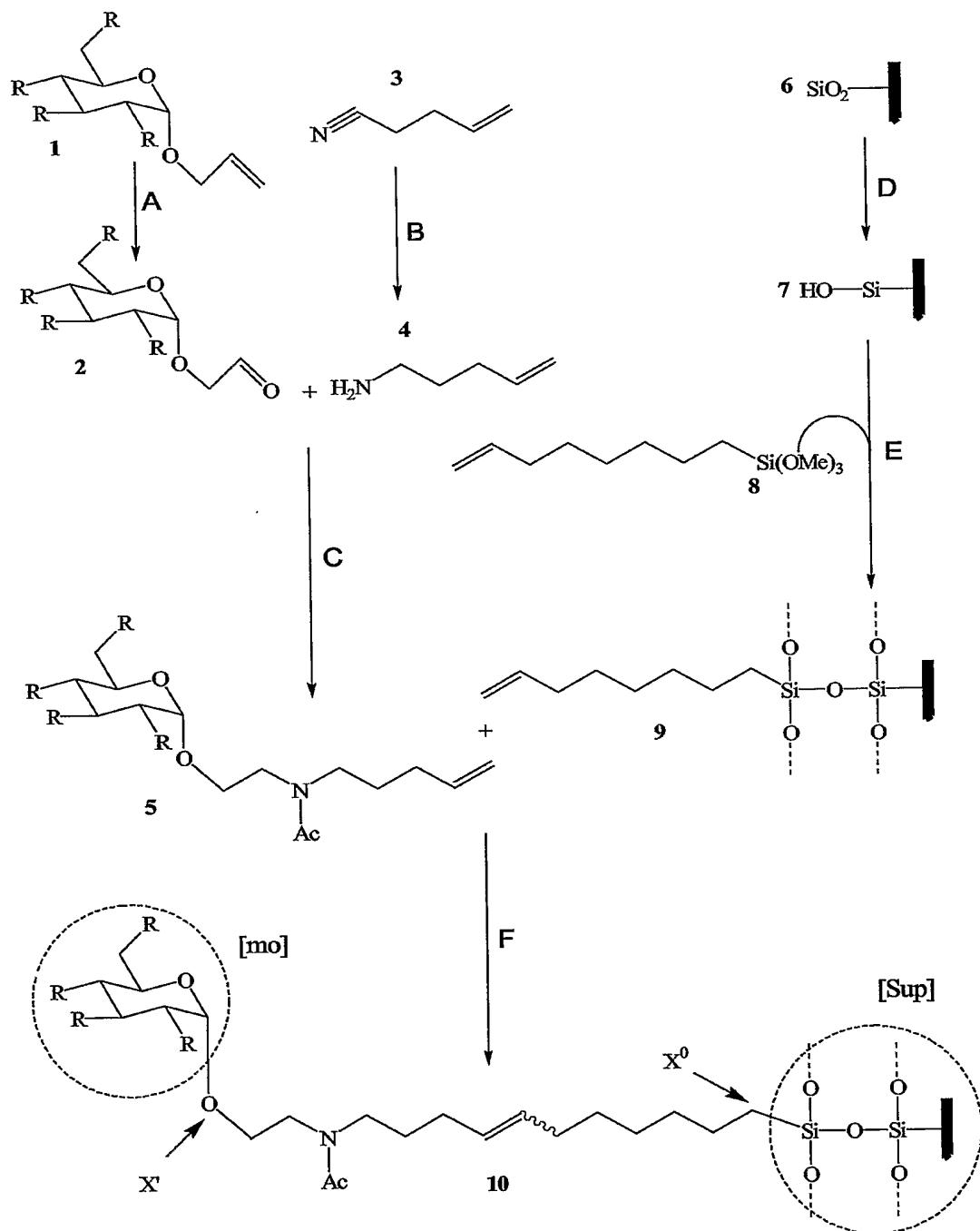
Les billes CPG silanisées (9) (2 g, 30 µmol/g) sont mises sous agitation dans le dichlorométhane (20 ml), sous atmosphère d'azote. Le système sucre-espacer (5) (300 µmol, >5 éq) est alors additionné, au milieu, avec un catalyseur de Grubbs (6 µmol, 5 mg, 0,1 éq). Le milieu réactionnel est alors porté à reflux, soit une température de 44°C.

Après 6 heures, une autre portion de catalyseur de Grubbs (6 µmol, 5 mg, 0,1 éq) est ajoutée. Le mélange est maintenu à 44°C pendant encore 6 heures, puis est ramené à température ambiante.

25 Les billes sont filtrées, et lavées abondamment au dichlorométhane et à l'éthanol (centrifugeuse). Les billes sont ensuite évaporées sous vide pour être séchées.

Les billes sucrées (10) sont ainsi obtenues.

30

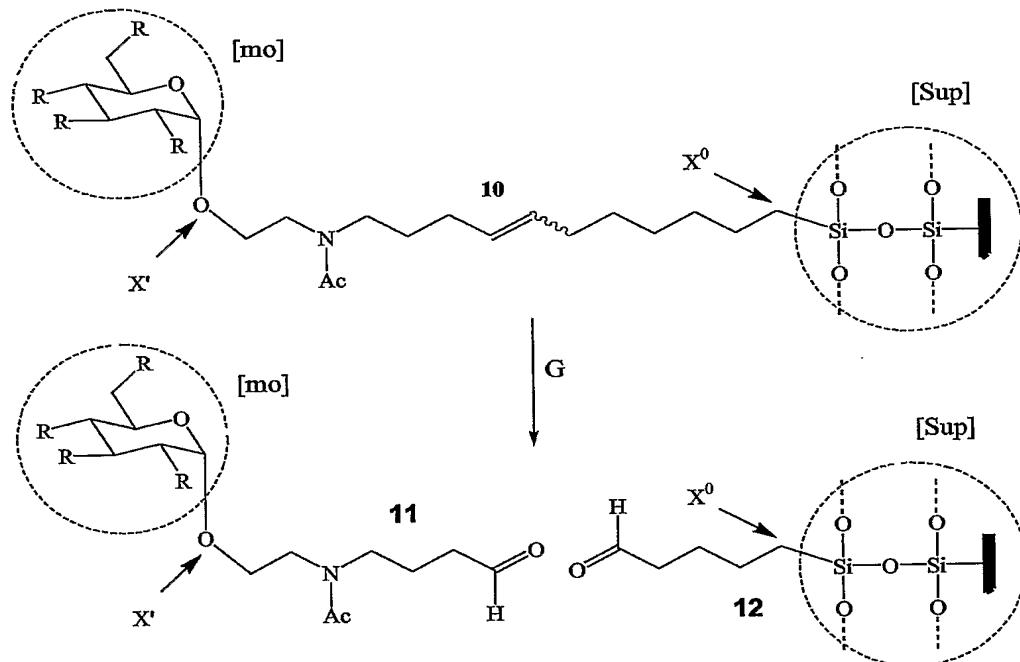
Schéma réactionnel des exemples A à F

**Exemple G : Clivage de la sonde (réaction G)**

Le procédé chimique utilisé est décrit dans le document [10].

Lorsque le système (10) (support solide-  
5 espaceur de la présente invention-chaîne oligosaccharidique) a été obtenu, il est possible de cliver l'espaceur, sans dénaturer la chaîne sucrée.

Le protocole expérimental est décrit dans le document [5]. L'équation chimique est la suivante :



10

Les billes CPG sucrées (10) sont mises sous agitation lente dans un mélange  
15 dichlorométhane/méthanol 1/1. Le milieu est amené à une température de -78°C (acétone+azote liquide).

Ensuite, on fait buller l'ozone  $O_3$  dans le milieu réactionnel jusqu'à ce qu'une couleur bleue apparaisse.

Ensuite, de l'argon bulle quelques minutes dans 5 le mélange, avant de neutraliser le milieu avec du diméthylsulfure puis le milieu réactionnel est laissé pour remonter vers la température ambiante pendant une nuit.

Les billes sont reprises au diéthyléther, 10 filtrées, rincées à plusieurs reprises au diéthyléther et à l'eau.

Les billes (12) sont alors mises de côté, et le surnageant est extrait (diéthyléther/eau), la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium  $MgSO_4$ , 15 évaporée sous vide et co-évaporée au toluène.

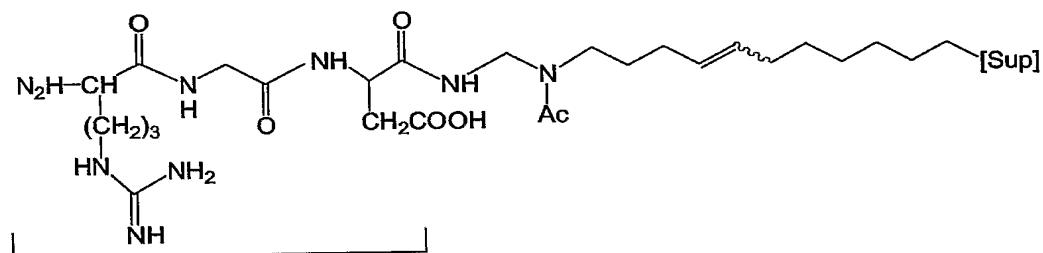
Le produit (11) est alors obtenu.

2) D'autres molécules selon l'invention ont été 20 fabriquées en utilisant les protocoles opératoires exposés ci-dessus (exemples A à F). Ces molécules sont détaillées dans les exemples suivants.

**Exemple H :**

25 Dans cet exemple, [mo] est un peptide RGD (Arg-Gly-Asp) accroché au bras espaceur de l'invention par son extrémité C-terminale. Le support est le même que dans le protocole opératoire exposé ci-dessus. Ainsi, 30 dans cet exemple, la molécule (1) du schéma réactionnel des exemples A à F est remplacée par RGD.

Des billes sur lesquelles le peptide RGD est accroché sont ainsi obtenues. Elles sont de formule :



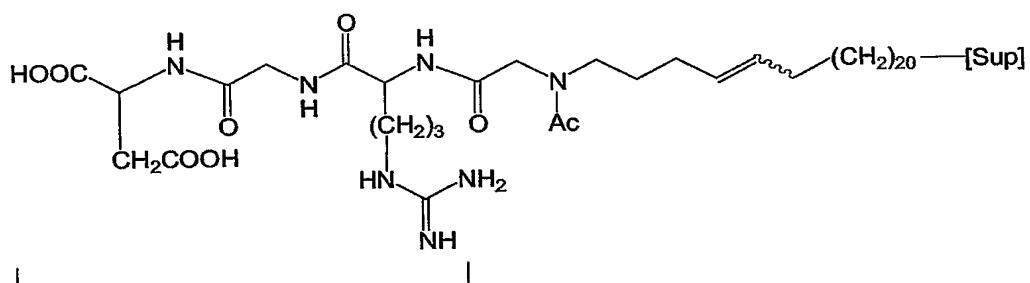
[mo] : peptide RGD accroché par C-terminal (Arg-Gly-Asp)

5 **Exemple I :**

Cet exemple utilise la même [mo] que dans l'exemple H, mais accroché au bras espaceur de l'invention par son extrémité N-terminale. De plus,

10 dans  $\xrightarrow[X^1]{R^1} [X^1]_n$  du bras espaceur de l'invention,  $X^1$  est C et  $n = 20$ . Par C, on entend bien entendu un carbone hydrogéné.

Les billes obtenues sont de formule :

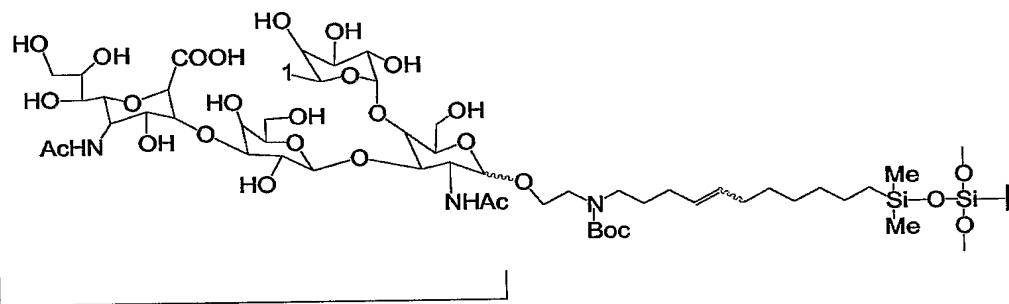


[mo] est un peptide RDG accroché par l'extrémité N-terminale

### Exemple J :

Dans cet exemple, [mo] est un « sialyl-lewis a ». Le support est le même que dans le protocole opératoire exposé ci-dessus. Le groupement protecteur est Boc. Sa chimie de fixation est connue de l'homme du métier.

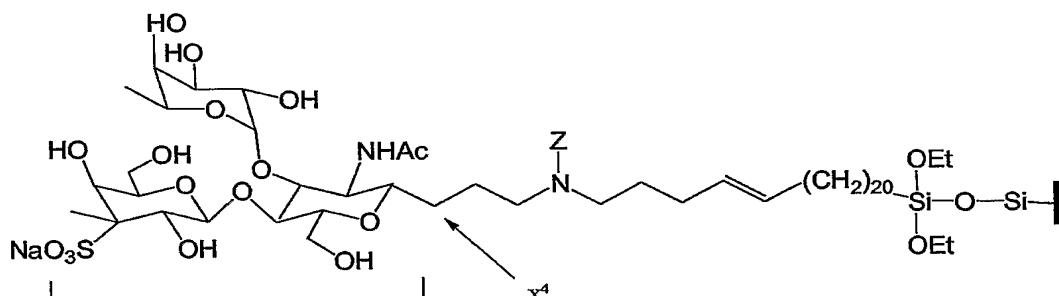
Des billes sur lesquelles le sialyl-lewis a est accroché sont ainsi obtenues. Elles sont de formule :



### 1.0 Exemple K :

Dans cet exemple, [mo] est un composé sulfaté. Le support est le même que dans le protocole opératoire exposé ci-dessus.

Des billes sur lesquelles le composé sulfaté est accroché sont ainsi obtenues. Elles sont de formule :



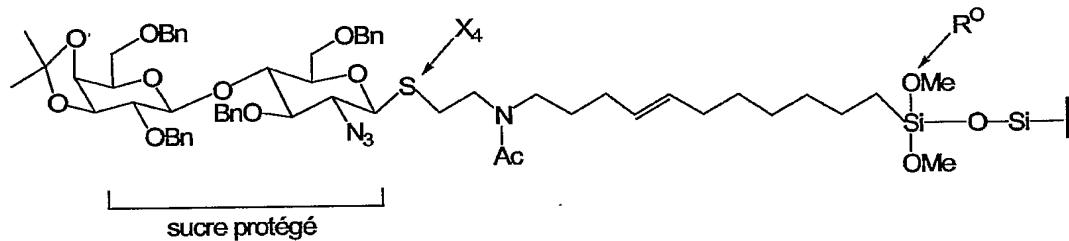
[mo] est un composé sulfaté, Z étant un groupe protecteur (par exemple Gp défini dans la partie "exposé de l'invention")

Dans un autre protocole, le carbone  $x^4$  a été remplacé par un atome de soufre. Les billes correspondantes ont été obtenues.

**Exemple L :**

Dans cet exemple, [mo] est un sucre protégé. Le support est le même que dans le protocole opératoire exposé ci-dessus.

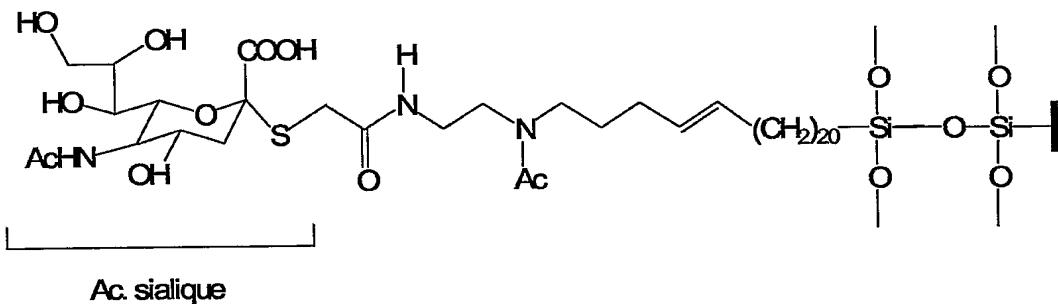
Des billes sur lesquelles le sucre protégé est accroché sont ainsi obtenues. Elles sont de formule :



**Exemple M :**

Dans cet exemple, [mo] est un acide sialique. Le support est le même que dans le protocole opératoire exposé ci-dessus.

Des billes sur lesquelles l'acide sialique est accroché sont ainsi obtenues. Elles sont de formule :



## Références bibliographiques

[1] WO-A-03/008927 : Dukler, N. Dotan, A. Shtavi, A. Gargir.

5 [2] H.M.I. Osborn, T.H. Khan, *Tetrahedron*, **1999**, 55, 1807-1850.

[3] D.A. Stetsenko, M.J. Gai, *Bioconjugate Chemistry*, **2001**, 12, 576-586.

[4] US-A-6,579,725 : P.H. Seeberger, R.B. Andrade.

10 [5] R. Roy, C.A. Laferrière, *Canadian Journal of Chemistry*, **1990**, 68, 2045-2054.

[6] L.H. Amundsen, L.S. Nelson, *Journal of the American Chemical Society*, **1951**, 73, 242-244.

15 [7] J.F. Tolborg, K.J. Jensen, *Chemical Communication*, **2000**, 147-148.

[8] F. Vinet, A. Hoang, EN 00 16940.

[9] K. Biswas, D.M., Coltart, S.J. Danishefsky, *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43, 6107-6110.

20 [10] C. Sylvain, A. Wagner, C. Miokowski, *Tetrahedron Letters*, **1997**, 38, 1043-1044.

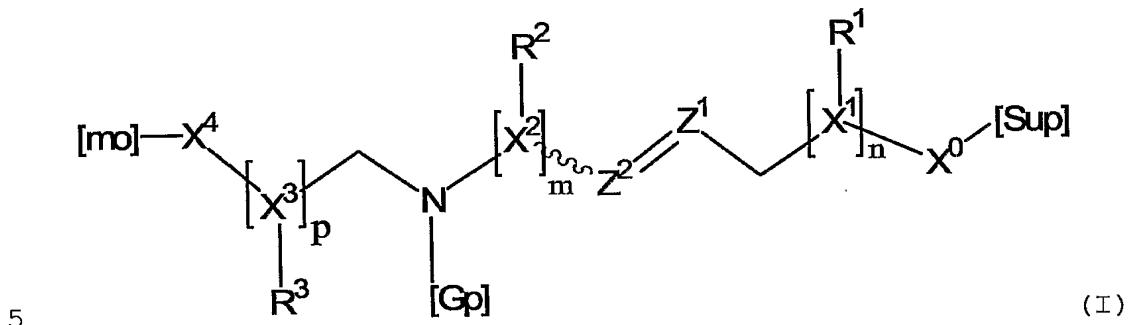
[11] Q.J. Plante, E.R. Palmacci, P.H. Seeberger, *Science*, **2001**, 291, 1523-1527.

[12] P.H. Seeberger, *Chem. Com.*, 2003, 1115-1121.

25 [13] D.M. Ratner, E.R. Swanson, P.H. Seeberger, *Org. Lett.* 2003, 4717-4720.

## REVENDICATIONS

1. Bras espaceur moléculaire de formule (I)  
suivante :



5 - dans laquelle  $X^0$  et  $X^4$  sont des substituants modulables de façon à permettre une liaison de [mo] et [Sup] via ledit bras espaceur,  $X^0$  et  $X^4$  étant différents de H et chacun choisis indépendamment des autres substituants du bras espaceur parmi C, O, N, S, Se, P, As, Si ; et

10 - dans laquelle les substituants  $X^1$  ;  $X^2$  ;  $X^3$  ;  $Z^1$  ;  $Z^2$  ;  $R^1$  ;  $R^2$  ; et  $R^3$  sont tels que :

- $X^1$  ;  $X^2$  ; et  $X^3$  sont chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi C, O, N, S, Se, P, As, Si et parmi un aryle et un hétéroaryl comprenant chacun de 2 à 20 atomes de carbone ;
- $Z^1$  et  $Z^2$  sont chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi C-R, Si-R, C, N, P et As, où R est un alkyle comprenant de 1 à 40 atomes de carbone ;
- $R^1$  ;  $R^2$  ; et  $R^3$  sont chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi H, un alkyle, un

aryle et un hétéroaryle comprenant chacun de 2 à 20 atomes de carbone ;

- [Gp] représente un groupement protecteur de l'amine secondaire -N- ou une molécule participant à la fonctionnalité du bras espaceur ;
  - 5 - dans laquelle n, m et p sont des nombres entiers, chacun supérieur ou égal à 1 et choisi indépendamment l'un de l'autre, de préférence de façon à ce que  $1 \leq n, m \text{ et } p \leq 40$  ;
  - dans laquelle [Sup] représente H ou un support solide silanisé sur lequel ledit bras espaceur peut être fixé de manière covalente ; et
  - dans laquelle [mo] représente H ou une unité moléculaire destinée à être fixée de manière covalente 10 par l'intermédiaire dudit bras espaceur sur ledit support solide silanisé.

2. Bras espaceur selon la revendication 1, .

dans lequel

- 20 •  $x^0$  et  $x^4$  sont choisis indépendamment des autres substituants parmi C, O, N, S, Si ; et/ou
- $x^1$  ;  $x^2$  ; et  $x^3$  sont choisis indépendamment des autres substituants parmi C, O, N, S, Si et parmi un aryle et un hétéroaryle comprenant chacun de 2 à 10 atomes de carbone ; et/ou
- 25 •  $z^1$  et  $z^2$  sont choisis indépendamment des autres substituants parmi C, N, C-R, Si-R, où R est un alkyle comprenant de 1 à 30 atomes de carbone ; et/ou

- $R^1$  ;  $R^2$  ; et  $R^3$  sont choisis indépendamment des autres substituants parmi H, un alkyle, un aryle et un hétéroaryle comprenant chacun de 2 à 10 atomes de carbone.

5

3. Bras espaceur selon la revendication 1, dans lequel le groupement protecteur [Gp] est choisi parmi Ac, Benzyle, un groupement aryle en  $C_1$  à  $C_{40}$ , Troc, z, TCA, BOC, Fmoc.

10

4. Bras espaceur selon la revendication 1, dans lequel le support solide [Sup], lorsqu'il est présent, est choisi parmi une plaque, une bille ou un capillaire.

15

5. Bras espaceur selon la revendication 1 ou 4, dans lequel [Sup] est à base de silice ou de verre.

20

6. Bras espaceur selon la revendication 1, dans lequel [mo], lorsqu'il est présent, est une molécule ayant un poids moléculaire allant de 180 à  $400000\text{ g.mol}^{-1}$ .

25

7. Bras espaceur selon la revendication 1, dans lequel [mo], lorsqu'il est présent, est choisi parmi les monosaccharides, les oligosaccharides, les poly-oligosaccharides, les glyco-conjugués, les peptides, les protéines, les enzymes, les glycoprotéines, les lipides, les acides gras, les glycolipides, les glycolipoprotéines.

30

8. Bras espaceur selon la revendication 1, dans lequel [mo], lorsqu'il est présent, est un sucre.

5 9. Utilisation d'un bras espaceur selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour fixer sur un support solide silanisé [Sup] une unité moléculaire [mo].

10 10. Utilisation selon la revendication 9, dans laquelle [mo] est une molécule ayant un poids moléculaire allant de 180 à 400000 g.mol<sup>-1</sup>.

15 11. Utilisation selon la revendication 9, dans laquelle [mo] est choisi parmi les monosaccharides, les oligosaccharides, les poly-oligosaccharides, les glyco-conjugués, les petites molécules naturelles ou synthétiques ; et [Sup] représente un support solide silanisé auquel le bras espaceur est susceptible d'être fixé.

20 12. Utilisation selon la revendication 9, dans laquelle [Sup] est choisi parmi une plaque, des billes ou un capillaire.

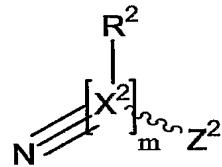
25 13. Utilisation selon la revendication 12, dans laquelle [Sup] est à base de silice ou de verre.

14. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 9 à 13 pour la fabrication d'une biopuce.

5 15. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 9 à 13 pour la fabrication d'une puce à sucre.

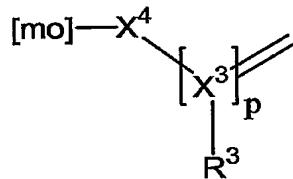
10 16. Procédé de fixation covalente d'une unité moléculaire [mo] sur un support par l'intermédiaire d'un bras espaceur, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

(i) réduction de la fonction nitrile d'un composé de formule :

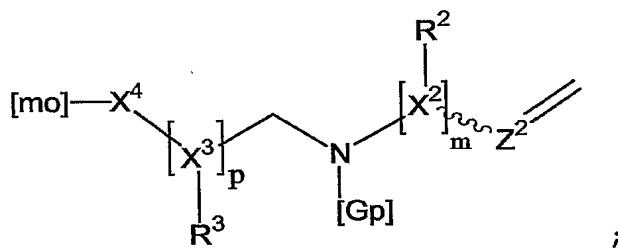


15

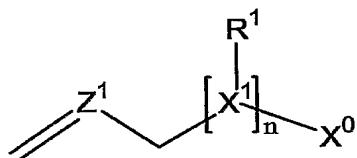
(ii) formation d'une fonction aldéhyde à partir d'une fonction allyle d'une molécule biologique de formule :



(iii) amination réductrice entre ladite fonction nitrile réduite suivie d'une protection de l'amine secondaire formée et ladite fonction aldéhyde pour obtenir une molécule biologique activée pour sa fixation sur le support, ladite molécule biologique activée étant de formule :



(iv) silanisation d'un support solide, et fonctionnalisation du support solide silanisé avec une molécule de formule :

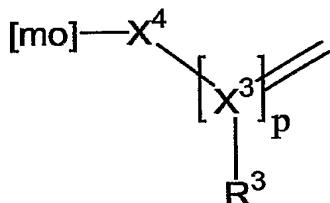


5

(v) réaction de métathèse entre la molécule fonctionnalisant le support et la molécule biologique activée pour former un bras espaceur selon l'invention reliant la molécule biologique et le support ;

10 procédé dans lequel les substituants  $X^0$  ;  $X^1$  ;  $X^2$  ;  $X^3$  ;  $X^4$  ;  $Z^1$  ;  $Z^2$  ;  $R^1$  ;  $R^2$  ;  $R^3$  ; et  $[mo]$  sont tels que définis dans la revendication 1.

15 17. Procédé selon la revendication 16, dans lequel le composé de formule



est un sucre allylé,  $[mo]$  étant ledit sucre.

18. Procédé selon la revendication 16, dans lequel [Sup] est choisi parmi une plaque, une bille ou un capillaire.

5 19. Procédé selon la revendication 16 ou 18, dans lequel [Sup] est à base de silice ou de verre.

10 20. Procédé selon la revendication 16, dans lequel [mo] est une molécule ayant un poids moléculaire allant de 180 à 400000 g.mol<sup>-1</sup>.

15 21. Procédé selon la revendication 16, dans lequel [mo] est choisi parmi les monosaccharides, les oligosaccharides, les poly-oligosaccharides, les glyco-conjugués, les peptides, les protéines, les enzymes, les glycoprotéines, les lipides, les acides gras, les glycolipides, les glycolipoprotéines.

20 22. Procédé selon la revendication 16, dans lequel [mo] est un sucre.

25 23. Procédé selon la revendication 16, comprenant en outre une étape de fixation d'un groupement protecteur [Gp] sur la fonction amine secondaire.

24. Procédé selon la revendication 23, dans lequel [Gp] est choisi parmi Ac, benzyle, un groupement aryle en C<sub>1</sub> à 40, Troc, z, TCA, BOC, Fmoc.

25. Utilisation d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 16 à 24 pour la fabrication d'une biopuce.

5 26. Utilisation d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 16 à 24 pour la fabrication d'une puce à sucre.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2005/050117

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C07H3/02 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C07H G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MORNET, R. ET AL: "Addition of saturated gliphatic organomagnesiums to nonconjugated disubstituted triple bonds" JOURNAL OF ORGANOMETALLIC CHEMISTRY, vol. 86, no. 1, 1975, pages 57-67, XP002302568 ISSN: 0022-328X the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,2

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

8 June 2005

22/06/2005

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Klein, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2005/050117

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BOUET, G. ET AL: "The addition of saturated aliphatic organomagnesium compounds to disubstituted, non-conjugated triple bonds. IV. The effect of a functional thioether group .alpha. to the triple bond. Catalytic action of copper" JOURNAL OF ORGANOMETALLIC CHEMISTRY, vol. 135, no. 2, 1977, pages 151-159, XP002302569 ISSN: 0022-328X the whole document -----	1,2
X	GERMON C ET AL: "ALKENYL-COPPER DERIVATIVES. 28 (1) : STEREOSPECIFIC SYNTHESIS OF TERTIARY ALLYLIC AMINES OF E OR Z CONFIGURATION" BULLETIN DE LA SOCIETY CHIMIQUE DE FRANCE, MASSON, PARIS, FR, vol. 9/10, no. 2, 1984, pages 377-389, XP008011272 ISSN: 0037-8968 compounds 2,7E,7Z,8 -----	1,2
X	BRYCE, MARTIN R. ET AL: "Metal-assisted fragmentation of N-aryl- and -alkyl-N-trimethylsilylaminosulfur chlorides and N-aryl- and -alkyl-aminosulfur chlorides in the presence of conjugated dienes: synthesis and reactivity of 2-substituted-3,6-dihydro-1,2-thiazines" JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, PERKIN TRANSACTIONS 1: ORGANIC AND BIO-ORGANIC CHEMISTRY, vol. 15, 1996, pages 1825-1831, XP009038623 ISSN: 0300-922X compounds 21 G,21 I -----	1,2
X	LAROCK, RICHARD C. ET AL: "Synthesis of Aryl-Substituted Allylic Amines via Palladium-Catalyzed Coupling of Aryl Iodides, Nonconjugated Dienes, and Amines" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 59, no. 26, 1994, pages 8107-8114, XP002302570 ISSN: 0022-3263 compounds 16,18,32,53,54,60, -----	1,2

-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2005/050117

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BARTA, NANCY S. ET AL: "Studies of the regiospecific 3-aza-Cope rearrangement promoted by electrophilic reagents" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 57, no. 26, 1992, pages 7188-7194, XP002302571 ISSN: 0022-3263 compound 23 -----	1,2
A	US 6 579 725 B1 (ANDRADE RODRIGO B ET AL) 17 June 2003 (2003-06-17) cited in the application -----	1-26
A	EP 0 906 324 A (BASF AG) 7 April 1999 (1999-04-07) -----	1-26
A	ANDRADE R B ET AL: "SOLID-PHASE OLIGOSACCHARIDE SYNTHESIS: PREPARATION OF COMPLEX STRUCTURES USING A NOVEL LINKER AND DIFFERENT GLYCOSYLATING AGENTS" ORGANIC LETTERS, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 1, no. 11, 1999, pages 1811-1814, XP000914375 ISSN: 1523-7060 -----	1-26

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2005/050117

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 6579725	B1	17-06-2003	US 2003232452 A1	18-12-2003
			CA 2363499 A1	08-09-2000
			EP 1175427 A2	30-01-2002
			JP 2002538163 A	12-11-2002
			WO 0052018 A2	08-09-2000
EP 0906324	A	07-04-1999	DE 19621177 A1	27-11-1997
			AT 203753 T	15-08-2001
			AU 2895797 A	05-01-1998
			BR 9709037 A	03-08-1999
			CA 2255559 A1	04-12-1997
			CN 1219937 A ,C	16-06-1999
			CZ 9803691 A3	14-04-1999
			DE 59704199 D1	06-09-2001
			WO 9745436 A1	04-12-1997
			EP 0906324 A1	07-04-1999
			ES 2161464 T3	01-12-2001
			HU 9901291 A2	28-07-1999
			JP 2000510851 T	22-08-2000
			KR 2000015933 A	15-03-2000
			NO 985462 A	23-11-1998
			US 6242583 B1	05-06-2001

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR2005/050117

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C07H3/02 G01N33/543

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 C07H G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	MORNET, R. ET AL: "Addition of saturated gliphatic organomagnesiums to nonconjugated disubstituted triple bonds" JOURNAL OF ORGANOMETALLIC CHEMISTRY, vol. 86, no. 1, 1975, pages 57-67, XP002302568 ISSN: 0022-328X le document en entier ----- -/-	1,2

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### ° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 juin 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22/06/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Klein, D

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR2005/050117

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>BOUET, G. ET AL: "The addition of saturated aliphatic organomagnesium compounds to disubstituted, non-conjugated triple bonds. IV. The effect of a functional thioether group .alpha. to the triple bond. Catalytic action of copper" JOURNAL OF ORGANOMETALLIC CHEMISTRY, vol. 135, no. 2, 1977, pages 151-159, XP002302569</p> <p>ISSN: 0022-328X</p> <p>le document en entier</p> <p>-----</p>	1,2
X	<p>GERMON C ET AL: "ALKENYL-COPPER DERIVATIVES. 28 (1) : STEREOSPECIFIC SYNTHESIS OF TERTIARY ALLYLIC AMINES OF E OR Z CONFIGURATION" BULLETIN DE LA SOCIETY CHIMIQUE DE FRANCE, MASSON, PARIS, FR, vol. 9/10, no. 2, 1984, pages 377-389, XP008011272</p> <p>ISSN: 0037-8968</p> <p>composés 2,7E,7Z,8</p> <p>-----</p>	1,2
X	<p>BRYCE, MARTIN R. ET AL: "Metal-assisted fragmentation of N-aryl- and -alkyl-N-trimethylsilylaminosulfur chlorides and N-aryl- and -alkyl-aminosulfur chlorides in the presence of conjugated dienes: synthesis and reactivity of 2-substituted-3,6-dihydro-1,2-thiazines" JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, PERKIN TRANSACTIONS 1: ORGANIC AND BIO-ORGANIC CHEMISTRY, vol. 15, 1996, pages 1825-1831, XP009038623</p> <p>ISSN: 0300-922X</p> <p>composés 21 G,21 I</p> <p>-----</p>	1,2
X	<p>LAROCK, RICHARD C. ET AL: "Synthesis of Aryl-Substituted Allylic Amines via Palladium-Catalyzed Coupling of Aryl Iodides, Nonconjugated Dienes, and Amines" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 59, no. 26, 1994, pages 8107-8114, XP002302570</p> <p>ISSN: 0022-3263</p> <p>composés 16,18,32,53,54,60,</p> <p>-----</p>	1,2
		-/-

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR2005/050117

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BARTA, NANCY S. ET AL: "Studies of the regiospecific 3-aza-Cope rearrangement promoted by electrophilic reagents" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 57, no. 26, 1992, pages 7188-7194, XP002302571 ISSN: 0022-3263 composé 23	1,2
A	US 6 579 725 B1 (ANDRADE RODRIGO B ET AL) 17 juin 2003 (2003-06-17) cité dans la demande	1-26
A	EP 0 906 324 A (BASF AG) 7 avril 1999 (1999-04-07)	1-26
A	ANDRADE R B ET AL: "SOLID-PHASE OLIGOSACCHARIDE SYNTHESIS: PREPARATION OF COMPLEX STRUCTURES USING A NOVEL LINKER AND DIFFERENT GLYCOSYLATING AGENTS" ORGANIC LETTERS, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 1, no. 11, 1999, pages 1811-1814, XP000914375 ISSN: 1523-7060	1-26

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No  
PCT/FR2005/050117

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
US 6579725	B1	17-06-2003	US	2003232452 A1		18-12-2003
			CA	2363499 A1		08-09-2000
			EP	1175427 A2		30-01-2002
			JP	2002538163 A		12-11-2002
			WO	0052018 A2		08-09-2000
<hr/>						
EP 0906324	A	07-04-1999	DE	19621177 A1		27-11-1997
			AT	203753 T		15-08-2001
			AU	2895797 A		05-01-1998
			BR	9709037 A		03-08-1999
			CA	2255559 A1		04-12-1997
			CN	1219937 A ,C		16-06-1999
			CZ	9803691 A3		14-04-1999
			DE	59704199 D1		06-09-2001
			WO	9745436 A1		04-12-1997
			EP	0906324 A1		07-04-1999
			ES	2161464 T3		01-12-2001
			HU	9901291 A2		28-07-1999
			JP	2000510851 T		22-08-2000
			KR	2000015933 A		15-03-2000
			NO	985462 A		23-11-1998
			US	6242583 B1		05-06-2001